

PAT-NO: JP408033661A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 08033661 A
TITLE: ARTIFICIAL BLOOD VESSEL AND ITS PRODUCTION
PUBN-DATE: February 6, 1996

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
SASAJIMA, TADAHIRO	
ASAII, HIDEAKI	
TANAKA, HAYAO	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
SUMITOMO BAKELITE CO LTD	N/A

APPL-NO: JP06171095

APPL-DATE: July 22, 1994

INT-CL (IPC): A61F002/06 , A61L027/00 , A61L033/00

ABSTRACT:

PURPOSE: To provide an artificial blood vessel capable of exhibiting high operability over a long period even with a small bore immobilizing elastin to the inside cavity surface of the artificial blood vessel in such a manner that the elastin suppresses the clotting activity of blood on the material surface and simultaneously suppresses the excess growth of cells and tissues so as to suppress the thickening of the internal membrane of an anastomosis part.

CONSTITUTION: The water-soluble elastin is coacervated directly on the inside cavity surface of an artificial blood vessel base material consisting of a synthetic resin after gelation or collagen is applied thereon and is fixed by a cross-linking agent and thereafter this elastic is fixed by a cross-linking agent.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

DERWENT- 1996-146061

ACC-NO:

DERWENT- 200556

WEEK:

COPYRIGHT 2008 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Artificial blood vessel mfr. comprises filling hollow artificial blood vessel base made of synthetic resin with buffer of water soluble elastin, then rotating

INVENTOR: ASAI H; SASAJIMA T ; TANAKA H

PATENT-ASSIGNEE: SUMITOMO BAKELITE CO LTD [SUMB]

PRIORITY-DATA: 1994JP-171095 (July 22, 1994)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
JP 08033661 A	February 6, 1996	JA
JP 3687995 B2	August 24, 2005	JA

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP 08033661A N/A		1994JP-171095	July 22, 1994
JP 3687995B2	Previous Publ	1994JP-171095	July 22, 1994

INT-CL-

CURRENT:

TYPE	IPC	DATE
CIPP	A61 L	27/00 20060101
CIPS	A61 F	2/06 20060101
CIPS	A61 L	33/00 20060101

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 08033661 A

BASIC-ABSTRACT:

Buffer of water soluble elastin with pH 4-7 and concn 1-30 wt% is filled in the following of artificial blood vessel base made of synthetic resin at 4-35°C. It is rotated at the rate of 1-10 rpm at

35-75 in order to provide the coacervated elastin layer on the surface of the hollow. After the soln is discharged from the hollow, bridge formation agent soln that water soluble bridge formation agent is dissolved in the pH 4-7 buffer so that the concn becomes 0.1-10 wt% is put in the hollow in order to form the bridge the coacervated elastin layer and provide the elastin layer on the surface of the hollow.

ADVANTAGE - Opening of the hollow is effectively maintained even the hollow is narrow, by controlling the solidifying of blood and the excessive growth of the cell.

TITLE- ARTIFICIAL BLOOD VESSEL MANUFACTURE COMPRISE FILL HOLLOW
TERMS: BASE MADE SYNTHETIC RESIN BUFFER WATER SOLUBLE ELASTIN
ROTATING

DERWENT-CLASS: A96 D22 P32 P34

CPI-CODES: A12-V02; D09-C01B;

ENHANCED- Polymer Index [1.1] 018 ; P0000; S9999 S1207 S1070;
POLYMER-

INDEXING: Polymer Index [1.2] 018 ; ND01; Q9999 Q8048 Q7987;
N9999 N7147 N7034 N7023; N9999 N7078 N7034 N7023;
N9999 N7329 N7078 N7034 N7023;

Polymer Index [1.3] 018 ; B9999 B5447 B5414 B5403
B5276; K9574 K9483;

Polymer Index [2.1] 018 ; G3714*R P0599 D01 F70;
M9999 M2073; L9999 L2391; L9999 L2073;

Polymer Index [2.2] 018 ; ND01; Q9999 Q8048 Q7987;
N9999 N7147 N7034 N7023; N9999 N7078 N7034 N7023;
N9999 N7329 N7078 N7034 N7023;

Polymer Index [2.3] 018 ; Q9999 Q7114*R; K9518 K9483;

Polymer Index [2.4] 018 ; B9999 B4988*R B4977 B4740;

Polymer Index [2.5] 018 ; A999 A157*R; B9999 B3521*R
B3510 B3372;

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: 1996-045572

Non-CPI Secondary Accession Numbers: 1996-122790

Disclaimer:

This English translation is produced by machine translation and may contain errors. The JPO, the INPIT, and those who drafted this document in the original language are not responsible for the result of the translation.

Notes:

1. Untranslatable words are replaced with asterisks (****).
2. Texts in the figures are not translated and shown as it is.

Translated: 05:58:00 JST 02/20/2008

Dictionary: Last updated 02/15/2008 / Priority: 1. Fiber/Clothing material / 2. Chemistry / 3. Industrial Products

[Document Name] Description

[Title of the Invention] An artificial blood vessel and its manufacture method

[Claim(s)]

[Claim 1] [have / it / the elastin layer which the inner surface of cavity of the artificial blood vessel base material which made the synthetic resin tubular and produced it is made to carry out the coacervation (condensation) of the water-soluble elastin, and is constructed for which a bridge and obtained by the cross linking agent] Or the artificial blood vessel which prepares the gelatin layer or collagen layer over which the bridge was constructed by the cross linking agent, is made to carry out the coacervation of the water-soluble elastin on it further, and is characterized by having the elastin layer constructed for which the bridge and formed of the cross linking agent.

[Claim 2] alpha-elastin or beta-elastin obtained by water-soluble elastin carrying out heat oxalic acid treatment of the elastin of the animal origin or human origin, The artificial blood vessel according to claim 1 characterized by being water-soluble elastin obtained by carrying out enzyme treatment of kappa-elastin obtained by carrying out alkali ethanol treatment of the elastin, or the elastin by pepsin or elastase.

[Claim 3] The artificial blood vessel according to claim 1 characterized by the cross linking agent of water-soluble elastin being guru tar aldehyde, dialdehyde starch, or a water-soluble

epoxy compound.

[Claim 4] The artificial blood vessel according to claim 1 characterized by the cross linking agent of a gelatin layer or a collagen layer being guru tar aldehyde, dialdehyde starch, or a water-soluble epoxy compound.

[Claim 5] What the artificial blood vessel base material made the synthetic resin fibrous, and made tubular by the plain weave or stockinet, What made the synthetic resin fibrous and was made rolled round and laminate on a mandrel and tubular [nonwoven nature], After [with extrusion molding] adding water-soluble substances, such as granular sodium chloride, to the thing and synthetic resin which made the synthetic resin tubular by extrusion molding and being tubular, The artificial blood vessel according to claim 1 characterized by being either although extension was added and it was considered as porous structure after making tubular the thing made into porous structure by dipping this underwater, or a synthetic resin by extrusion molding.

[Claim 6] The artificial blood vessel according to claim 5 characterized by the synthetic resin which forms an artificial blood vessel base material being polyurethane, polyester, or polytetrafluoroethylene.

[Claim 7] [the buffer solution of the water-soluble elastin which added water-soluble elastin to the lumen of the artificial blood vessel base material produced by the synthetic resin at a rate that concentration becomes to the buffer solution of pH=4 - 7 at 1 - 30wt%] [filling up with 4 degrees C or more less than 35 degrees C, and keeping an artificial blood vessel base material level to a longitudinal direction] After building the layer to which it was made to rotate in the direction of the circumference of an artificial blood vessel base material at velocity of 0.1-10rpm below 35 degrees C or more 70 degrees C, and the coacervation of the elastin was carried out on the inner surface of cavity, By discharging the solution of a lumen, putting into a lumen the cross linking agent solution which dissolved the water-soluble cross linking agent next at a rate that concentration becomes 0.1 - 10wt% to the buffer solution of pH=4 - 7, and making the coacervate layer of water-soluble elastin construct a bridge The manufacture method of the artificial blood vessel characterized by building an elastin layer to the inner surface of cavity of an artificial blood vessel.

[Claim 8] By dipping the artificial blood vessel base material created by the synthetic resin into the solution which added gelatin or collagen at a rate that concentration becomes 1 - 10wt% to the buffer solution of pH=3 - 8 Gelatin or collagen is infiltrated between the fibers of an artificial blood vessel base material, or into the hole of a porous artificial blood vessel base material. Furthermore, a gelatin layer or a collagen layer is made to form also on the inner surface of cavity of an artificial blood vessel base material. [the lumen of this artificial blood vessel base material] after making a gelatin layer or a collagen layer construct a bridge in a cross linking agent [filling up with 4 degrees C or more less than 35 degrees C the buffer solution of the water-soluble elastin which added water-soluble elastin at a rate that concentration becomes 1 - 30wt% to the buffer solution of pH=4 - 7, and keeping an artificial blood vessel base material level to a longitudinal direction] It is made to rotate in the direction of the circumference of an artificial blood vessel base material at velocity of 0.1-10rpm below 35 degrees C or more 70 degrees C. Build the layer to which the coacervation of the elastin was carried out on an inner surface of cavity, and the solution of a lumen is discharged. Next, by putting into a lumen the cross linking agent solution which dissolved the water-soluble cross linking agent at a rate that concentration becomes 0.1 - 10wt% to the buffer solution of pH=4 - 7, and making the coacervate layer of water-soluble elastin construct a bridge The manufacture method of the artificial blood vessel characterized by building an elastin layer to the inner surface of cavity of an artificial blood vessel.

[Claim 9] What made the synthetic resin fibrous and was made tubular by the plain weave or stockinet weave as a base material of an artificial blood vessel, What made the synthetic resin fibrous and was made rolled round and laminate on a mandrel and tubular [nonwoven nature], After [with extrusion molding] adding water-soluble substances, such as granular sodium chloride, to the thing and synthetic resin which made the synthetic resin tubular by extrusion molding and being tubular, The manufacture method of an artificial blood vessel according to claim 7 or 8 characterized by using either although it was considered as porous structure by extending after making tubular the thing made into porous structure by dipping this underwater, or a synthetic resin by extrusion molding.

[Claim 10] The manufacture method of an artificial blood vessel according to claim 9 characterized by using polyurethane, polyester, or polytetrafluoroethylene as a synthetic resin which produces the base material of an artificial blood vessel.

[Claim 11] The manufacture method of an artificial blood vessel according to claim 7 or 8 characterized by constructing a bridge in water-soluble elastin with guru tar aldehyde, dialdehyde starch, or a water-soluble epoxy compound.

[Claim 12] alpha-elastin or beta-elastin by which heat oxalic acid treatment may be carried out in elastin of the animal origin or human origin as water-soluble elastin, The manufacture method of an artificial blood vessel according to claim 7 or 8 characterized by using the water-soluble elastin obtained by processing kappa-elastin obtained by carrying out alkali ethanol treatment of the elastin, or elastin by pepsin or elastase.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the artificial blood vessel used for the bypass surgery and the displacement way of a living body blood vessel when treating a blood vessel disease. Furthermore, by forming a structure similar to the internal elastic lamina of a living body blood vessel in the inner surface of cavity of an artificial blood vessel in detail, the coagulation of blood and adhesion of plasma proteins are controlled, and ***** thickness is not started with a small caliber, either, but it is related with the artificial blood vessel which has high patency, and its manufacture method.

[0002]

[Description of the Prior Art] Blood vessel diseases, such as obstructive arteriosclerosis, are increasing and the blood circulation reconstruction way using vascular graft is briskly performed by a diabetic increase, aging, etc. by improvement in eating habits in recent years. Various artificial blood vessels are developed in such a situation, and the large caliber artificial blood vessel with an inside diameter of 7-38mm which can be used for reconstruction of a

chest main artery, an abdominal aorta, a femoral artery, etc., etc. is already put in practical use. However, although it depends on the private internal thoracic artery or the great saphenous vein chiefly and reconstruction of reconstruction of the coronary arteries for lifesaving of the patient of ischemic heart disease, the popliteal artery under a knee, or a tibia artery is expected development of a small caliber artificial blood vessel with an inside diameter of 3-6mm The present condition is that the small caliber artificial blood vessel which can be used being able to be satisfied with these reconstruction is not yet developed.

[0003] Having the outstanding anti-thrombus nature as performance required for an artificial blood vessel, and not producing the blockade by a thrombus and having the outstanding histocompatibility, and intima and adventitia being formed at an early stage, and stabilizing are called for. Although the anti-thrombus nature which was excellent in especially the small caliber artificial blood vessel since a thrombus blockade was escaped turns into indispensable characteristics, the organization hypermorphosis of an anastomotic region, i.e., anastomosis circles film ** thickness, is formed highly as the high artificial blood vessel of anti-thrombus nature, and it blockades. That is, it is difficult for a high material of anti-thrombus nature to increase the histocompatibility of a high material of anti-thrombus nature bad [anti-thrombus nature and histocompatibility are opposite characteristics, and / histocompatibility] (Tadahiro Sasajima, NIKKEI MEDICAL, the February 10, 1992 issue). Coexistence of the anti-thrombus nature and histocompatibility where formation of few thrombi or ***** thickness caused a blockade from that a lumen is thin and there being little blood flow volume and which were excellent in the small caliber is an important technical problem in development of a small caliber artificial blood vessel.

[0004] For example, although the histocompatibility of a Dacron artificial blood vessel is good, anti-thrombus nature is inadequate, and it cannot be used for a small caliber artificial blood vessel. On the other hand, it is not more than fibril length 30micro. Although the artificial blood vessel made from ePTFE (extension Teflon) has comparatively good anti-thrombus nature, if it is easy to form anastomosis circles film ** thickness, a degree of porosity is raised and histocompatibility is given, anti-thrombus nature will fall and a thrombus blockade will be carried out at an early stage in a low blood-flow-volume region. Moreover, several sorts of chemical modification living body origin vascular graft is developed these days, although a certain thing shows very good anti-thrombus nature, its histocompatibility is structurally poor, all produce anastomosis circles film ** thickness too in several after-transplantation months, and the many have the problem of resulting in a blockade.

[0005]

[Problem to be solved by the invention] this invention -- the conventional artificial blood vessel - it is going to solve such a problem. Although a human **** vein has the internal elastic lamina which makes developed elastin a principal component [the human **** vein graft which carried out chemistry immobilization of this] At the time of extraction and chemistry immobilization, it is damaged, an internal elastic lamina exfoliates, and thrombus formation is remarkable in this exfoliation part. The portion by which the internal elastic lamina is preserved showed high anti-thrombus nature to generating the ***** thickness accompanying this, and by the anastomotic region, since ***** thickness was not generated, it was shown that histocompatibility is also excellent (Tadahiro Sasajima et al., an artificial organ, 20 (2), 414-419 (1991)). While paying one's attention to the biological conformity as an artificial blood vessel of elastin intima by making these research findings into a background It finds out that the film surface which is equal to an artificial blood vessel inner surface of cavity uniformly at an internal elastic lamina can be built by using elastin of living body origin, and it inquires wholeheartedly and comes to complete this invention.

[0006]

[Means for solving problem] [namely, the inner surface of cavity of the artificial blood vessel base material which this invention made the synthetic resin tubular and was produced] [have / it / the elastin layer constructed for which a bridge and obtained by the cross linking agent in water-soluble elastin] Or the gelatin layer or collagen layer over which the bridge was constructed by the cross linking agent is prepared, and it is related with the artificial blood vessel which has the elastin layer further constructed for which the bridge and formed of the cross linking agent in water-soluble elastin on it, and its manufacture method.

[0007] In order to detain the artificial blood vessel base material used by this invention in the living body where the peroxide dialytic ferment emitted [macrophage] as a pass of blood and hydrolase exist for a long period of time, It is required to be the material which it is not decomposed by the enzyme etc. in the living body, and there is no toxicity, and can be equal to

change of blood pressure enough, and synthetic resins, such as polyurethane, polyester, and polytetrafluoroethylene, are desirable as the quality of the material. Since the compliance near a living body blood vessel is obtained, especially polyurethane is desirable. Moreover, in order to fix gelatin, collagen, elastin, etc. to the inner surface of cavity of the artificial blood vessel base material produced tubular firmly, the structure of an inner surface of cavity has porosity, the thing which knit the fiber, or the desirable thing of the structure in which the fiber was piled up. The Reason is because gelatin, collagen, elastin, etc. enter between the hole of a base material, or a fiber and a strong anchor effect is acquired in the base material of such a structure.

[0008] Moreover, when making an artificial blood vessel base material from what made the synthetic resin fibrous, it is appropriate for the diameter of a fiber to consider it as the range of 5-50 micrometers. When it was considered as a plain weave or stockinet in 5 micrometers or less, or laminates on a mandrel and presupposes that it is tubular, A fiber interval becomes narrow too much, it cannot enter and neither gelatin, nor collagen, elastin, etc. can fully be fixed firmly, even after planting to the living body, it cannot enter and **** recovery of the cell cannot be carried out. With 50 micrometers or more of diameters of a fiber, there are few scaffolds which a fiber interval is too large and fix gelatin, collagen, elastin, etc., and they cannot fix these firmly.

[0009] Moreover, although the elastin which can be used by this invention does not carry out limitation in particular Buta main artery origin elastin, cow head ligament origin elastin, cow lung origin elastin, Elastin, such as cow main artery origin elastin, human lung origin elastin, and human main artery origin elastin, Or the elastin protein which processed with enzymes, such as alpha-elastin which made these water solubility by heat oxalic acid treatment or beta-elastin, kappa-elastin made into water solubility by alkali ethanol treatment, pepsin, and elastase, and was made into water solubility is mentioned. Although human main artery origin elastin is especially desirable in respect of histocompatibility and anti-thrombus nature and the details of the Reason are unknown Elastin differs in amino acid composition a little according to the kind of the origin part and animal, and especially with the amino acid composition which human main artery origin elastin has, since the back after bridge formation can be made smooth, it is considered for being hard to cause the coagulation activity of blood.

[0010] Moreover, the thing of animal origin can be used as the gelatin used by this invention,

and collagen. The purpose which prepares the layer of gelatin or collagen beforehand before preparing an elastin layer is for being filled up with the pore on the surface of inner of an artificial blood vessel base material which mainly has porous structure as mentioned above, and increasing the Taira slippage of an artificial blood vessel inner surface of cavity. A gelatin layer and a collagen layer contact blood and directly, or although it does not act, it becomes possible by making smooth an artificial blood vessel inner surface of cavity in micro to control the coagulation activity of blood.

[0011] In the process which forms a gelatin layer or a collagen layer in the base material inside of an artificial blood vessel by this invention Although the buffer solution of pH=3 - 8 which dissolves gelatin or collagen does not carry out limitation in particular Citric acid / sodium hydroxide buffer solution, formic acid / sodium formate buffer solution, citric acid / sodium citrate buffer solution, acetic acid / sodium acetate aqueous solution, succinic acid / sodium hydroxide aqueous solution, phosphoric acid buffer solution, sodium dihydrogenphosphate / sodium hydroxide buffer solution, etc. are mentioned. To gelatin, the buffer solution of pH=7 is desirable, and the buffer solution of pH=3.3 is especially desirable to collagen. This Reason is because gelatin is stabilized, and can construct a bridge in the pH=7 neighborhood and cannot do collagen by more than pH=4 with the aqueous solution which was easy to produce precipitation and where it was stabilized.

[0012] Moreover, in this process, the concentration of gelatin and collagen has 1 - 10wt% of a desirable range to buffer solution. [if this Reason has too low concentration, the gelatin layer or collagen layer of sufficient thickness will not be obtained but a base material will be exposed, and] It is because it is difficult to make smooth the artificial blood vessel inner surface of cavity which the viscosity of a solution rises, cannot enter in the hole of an artificial blood vessel base material, or network, and is constructed for which a bridge and obtained in gelatin or collagen in micro when concentration is too high.

[0013] Moreover, limitation in particular is not carried out that the buffer solution which uses water-soluble elastin in the process which carries out a coacervation (condensation) on the artificial blood vessel inner surface of cavity which prepared the direct or gelatin layer or the collagen layer on the inner surface of cavity of the base material of an artificial blood vessel should just be the thing of the range of pH=4 - 7. [since aforementioned gelatin or collagen is

dissolved, can use the same thing as a buffer solution, but] The citric acid / sodium hydroxide buffer solution which has buffer capacity sufficient by pH=5 especially, the citric acid / sodium citrate buffer solution, the acetic acid / sodium acetate aqueous solution, the succinic acid / sodium hydroxide aqueous solution, etc. are suitable for carrying out the coacervation of the water-soluble elastin. The isoelectric point of water-soluble elastin is near this, the elastin neutralized electrically tends to produce a canal-canal interaction, and this is considered to be because for a coacervation to be stabilized.

[0014] Moreover, it comes out of the quantity which dissolves water-soluble elastin in buffer solution to use in 1 - 30wt% of the range to the buffer solution of pH=4 - 7. This Reason is because the elastin layer formed in the inner surface of cavity of an artificial blood vessel will become uneven if it will be hard to carry out the coacervation of the water-soluble elastin if the concentration of elastin is too lower than 1wt%, and concentration is too higher than 30wt%. Moreover, since temperature tends to produce the denaturation of elastin at a temperature higher than 70 degrees C and the coacervation of the water-soluble elastin cannot be carried out at the low temperature below 35 degrees C, the range of 35-70 degrees C is desirable.

[0015] Furthermore, in order to form an elastin layer on the inner surface of cavity which prepared the direct or gelatin layer or the collagen layer on the inner surface of cavity of the base material of an artificial blood vessel Although it is also possible to apply the water-soluble elastin which applied the solution of water-soluble elastin, constructed the bridge in the cross linking agent; or was beforehand mixed with the cross linking agent, and to construct a bridge by heating or light Since the anti-thrombus nature and histocompatibility of an elastin layer in which the way which constructs a bridge was formed are good after carrying out a coacervation, it is desirable. Although this Reason is not clear, elastin exists, where coacervate (floc) is formed in the living body, and is considered because the tertiary structure of the molecule at this time is important for the bioactive of elastin.

[0016] As a cross linking agent for making a gelatin layer, a collagen layer, or the layer of water-soluble elastin that carried out the coacervation construct a bridge in each process in this invention Although guru tar aldehyde which is a water-soluble cross linking agent, dialdehyde starch or a water-soluble epoxy compound, etc. can be used Especially, it can react with an amino group and the functional group of both carboxyl groups, and since after

bridge formation gives a soft protein layer, it can obtain the compliance near a living body blood vessel, and as for a water-soluble epoxy compound, it is especially desirable.

[0017] Moreover, [in order to make an artificial blood vessel inner surface of cavity carry out the coacervation of the water-soluble elastin uniformly, are based also on the inside diameter of the artificial blood vessel to produce, but] In an artificial blood vessel with an inside diameter of 2-6mm, it is desirable to make it rotate in the direction of the circumference calmly with the revolving speed of 0.1-10rpm, keeping level to a longitudinal direction the artificial blood vessel filled up with the elastin aqueous solution. If this Reason puts elastin gently at the temperature of 35 degrees C or more, in order to use the characteristics that elastin carries out a coacervation in the gravity direction, and forms coacervate (floc) in it, The elastin solution with which the lumen was filled up when revolving speed was too quick will be agitated. It is because a **** coacervation cannot be formed on an inner surface of cavity, and an elastin layer cannot be uniformly formed in an artificial blood vessel inner surface of cavity since the movement speed of an artificial blood vessel inner surface of cavity becomes slow from the coacervation velocity of elastin if revolving speed is too slow.

[0018]

[Working example] Below, a work example explains the effect of this invention. [A work example 1 and comparative example 1] (1) Preparation of a solution and manufacture polyurethane resin (Bayh Omar by U.S. ECHIKON) of an artificial blood vessel [the thing 10 micrometers in diameter which it extrudes fibrous and is rolled round to the mandrel made from stainless steel with a 4mm/ in diameter / phix length of 1m] The network-like artificial blood vessel base material with an inside diameter [of 4mm] phix length of 1m was produced. Moreover, carry out heat oxalic acid treatment of the **** ligament origin elastin (made by an elastin product company), and it is made water solubility. alpha-elastin 400mg which was made to condense according to a coacervation and was refined was dissolved in pH=4.0 acetic acid / sodium acetate buffer solution of 20ml by 4 degrees C, and the elastin aqueous solution was produced.

[0019] Next, the artificial blood vessel base material obtained above was cut in length of 10cm, and it inserted and equipped into the jig which attaches a three way stop cock to both ends,

attaches gear to the central part further, and enabled it to rotate by a motor with the inside diameter phix12cm glass tube of 4.5mm. Were filled up with the elastin aqueous solution from one three way stop cock, and made the motor SUTATO, heating at 60 degrees C, it was made to rotate at 5rpm for 12 hours, and the coacervation of the elastin was carried out to the inside of the artificial blood vessel base material. opening a three way stop cock, throwing away the solution in a pipe here, and continuing -- a 20mg water-soluble epoxy cross linking agent (DENAKORU EX-614B --) It was filled up with the aqueous solution which dissolved the Nagase make in 20ml of phosphate buffer solutions of pH=7.0 in the artificial blood vessel, and bridge formation was performed at 60 degrees C for 24 hours, making it rotate at velocity of 5rpm, and the artificial blood vessel which has an elastin layer about 100 micrometers thick in an inner surface of cavity was obtained.

[0020] ** One beagle adult dog (feminity) with an animal experiment weight of 11kg was pretreated in atropine, and introductory anesthesia was carried out by intravenous injection of flunitrazepam 0.1mg/kg and ketamine 3mg/kg. [injecting heparin (100U/kg) intravenously after fixing a dog to an operating table, and maintaining anesthesia by Fluothane] The abdomen was cut open, the renal artery abdomen main artery was excised 5cm, and the artificial blood vessel which uses 6-0 polypropylene yarn here and has the elastin layer of this invention with an inside diameter [of 4mm] phix length of 5cm by some parts anastomosis was planted. Moreover, the with an inside diameter [of 4mm] phix length of 5cm guru tar aldehyde treatment human **** vein artificial blood vessel (Dardik Biograft) was planted in the renal artery abdomen main artery of a crossbred adult dog (feminity) with a weight of 11kg as a comparative example.

[0021] After the operation and no anticoagulant were used, but bred the dog for six months. Pretreat a dog in atropine in six months, and introductory anesthesia Flunitrazepam 0.1mg/kg, Having carried out by intravenous injection of ketamine 3mg/kg, having injected heparin (100 IU/kg) intravenously after fixing a dog to an operating table, and maintaining anesthesia by Fluothane, the abdomen was cut open and both the artificial blood vessels planted in the renal artery abdomen main artery were extracted with the host blood vessel. The physiological saline which dissolved 2500IU / 500ml of heparin using the syringe washes calmly the inside-and-outside side of an artificial blood vessel immediately. Dardik Biograft of the artificial blood vessel which flushes blood, clears an artificial blood vessel perpendicularly, observes macroscopically, and has the elastin layer of this invention, and a comparative example It compared.

[0022] Next, two artificial blood vessels were comparatively made into length, and after immersing one side in the neutral buffer solution of formalin 4% and fixing, it was considered as the sample for optical microscopes. It dipped and fixed to the neutral buffer solution of 1% guru tar aldehyde, and the neutral buffer solution of 3% guru tar aldehyde, and the remaining samples were made into the sample for electron microscopes. The sample for optical microscopes was cut to three, the center side anastomotic region, the central part, and the tip side anastomotic region, after it washed formalin, paraffin embedding was carried out, and cut down the section from each part and used it as the prepared slide. Next, it dyed by dipping [dip in a hematoxylin solution for 5 minutes, and / 1% / in EOJIN liquid] after a flush and enclosing [wash, dehydrate and]. The observation by an optical microscope is Dardik Biograft of an artificial blood vessel and a comparative example which carries out in 40 times and 100 times, measures the thickness of the intima which was newly born, respectively by the center side anastomotic region, the central part, and the tip side anastomotic region, and has the elastin layer of this invention. The grade of ***** thickness was measured.

[0023] Moreover, 0.1M sodium cacodylate buffer solution washes the sample for electron microscopes enough after guru tar aldehyde immobilization. The sample was dried by t-butanol lyophilization, after osmium and 1% tannic acid performed electric conduction treatment 1% by dividing into three, the center side anastomotic region, the central part, and the tip side anastomosis, and it fixed to the sample stand, and Pt-Pd was vapor-deposited. Electron microscope observation is Dardik Biograft of an artificial blood vessel and a comparative example which has the elastin layer of this invention. 200 times and 1000 times observed and estimated the state of the inner surface of cavity.

[0024] In addition, the optical microscope used the DIAPHOT-TMD type by NIKON CORP., and the scanning electron microscope used the Hitachi type S-2400. ** The evaluation result of each artificial blood vessel of an evaluation result work example and a comparative example was as having been shown in Table 1.

[0025]

[Table 1]

表1 人工血管の評価結果

評価項目	実施例1	比較例1
肉眼的観察結果	内腔面は全体に光沢のある白色を呈し、血栓の付着は見られず、中枢及び末梢の両吻合部とも縫合糸が透けて見え、吻合部パンヌスは見られなかった。	内腔面は光沢のある白色を呈している部分もあったが、所々に血栓の付着が見られ、末梢側吻合部にて吻合部パンヌスの成長と剥離が認められた。
光顕的観察結果 (組織評価)	中枢側吻合部、末梢側吻合部では表面に一層の細胞層を持つ、平均 $20 \mu\text{m}$ の新生内膜層が見られた。宿主血管と人工血管との吻合部は平滑で吻合部内膜肥厚は全く見られなかった。中央部では数ミクロンの僅かな纖維成分の付着が見られたのみで内膜の肥厚は見られなかった。	末梢側吻合部では最大 $300 \mu\text{m}$ の吻合部内膜肥厚が認められた。中枢側吻合部でも軽度であるが $150 \mu\text{m}$ 程度の内膜の肥厚が認められた。中央では纖維成分の付着が主に見られ、細胞成分は見られなかった。
走査型電子顕微鏡観察結果	中枢側及び末梢側吻合部では吻合部から 5 mm 程度まで内皮細胞様の細胞で覆われていたが、細胞の過剰成長や内膜の肥厚は見られなかった。中央部では血漿蛋白と思われる蛋白成分の僅かな付着が見られたが、血球やフィブリンなどの付着は見られなかった。	末梢側吻合部では吻合部から人工血管へ約 5 mm 程度まで新生内膜が剥離したパンヌスが見られ、剥離したパンヌスの下に器質化した血栓とおもわれる血球成分を多量に含む纖維状の付着物が観察された。中枢側吻合部では内皮細胞様細胞の伸展が見られたが、所々フィブリンの付着が認められた。中央部では血漿蛋白と思われる蛋白成分の付着が主で所々にフィブリンの付着が認められた。

[0026] [A work example 2 and comparative example 2] (1) [preparation of a solution and the phosphoric acid buffer solution (pH=7) of 2% of production gelatin of the petri dish which has an elastin layer on a gelatin layer] After 2ml's adding on the petri dish for cell cultures of 35mmphi (Sumitomo Bakelite Co., Ltd. make MS-1035) and extending uniformly on it, it put

gently at 4 degrees C for 2 hours, and gelatin was made to gel. Then, 3ml of phosphate buffer solutions (pH=7) of guru tar aldehyde were added 2%, and the bridge was constructed by putting gently for 24 hours at 4 degrees C.

[0027] Next, carry out heat oxalic acid treatment of the **** ligament origin elastin (made by an elastin product company), and it is made water solubility. [alpha-elastin 40mg which was made to condense according to a coacervation and was refined] The solution which dissolved in pH=4.0 acetic acid / sodium acetate buffer solution of 2ml at 4 degrees C was prepared, and it added in the petri dish which fixed the above-mentioned gelatin layer, and put gently at 50 degrees C for 12 hours, and the coacervation of the elastin was carried out on the gelatin layer. Throw away the solution in a petri dish here and it seals by adding 3ml of aqueous solutions which dissolved the 20mg water-soluble epoxy cross linking agent (DENAKORU EX-521, Nagase make) in 20ml of phosphate buffer solutions of pH=7.0 in a petri dish. petri dish production with an inside diameter [phi] of 3.5mm which performs bridge formation at 60 degrees C for 24 hours, and has an elastin layer on a gelatin layer -- it carried out.

[0028] ** A petri dish with an inside diameter [phi] of 3.5mm which has an elastin layer on a cell culture gelatin layer, And it is the human cervical cancer origin Hela of 1x10⁴-piece [/ml] concentration, respectively to the petri dish for cell cultures with an unsettled as a comparison sample inside diameter [phi] of 3.5mm. Seeding of every 2ml of the cells was carried out, and it cultivated at 37 degrees C for four days by the basal medium MEM (made by Dainippon Pharmaceutical) containing 10% (made by Dainippon Pharmaceutical) of a hook blood serum. The culture medium was exchanged for a thing new day by day [2], all cells were removed with the cell scraper on the 4th day of culture, and it was considered as the floating solution of the cell.

[0029] Next, 100micro of phosphoric acid buffer solution I of 0.3% trypan blue was added and dyed 100micro of this cell floating solution I, it observed with the 10-time-as many objective as this with the inverted microscope on the blood-cell-counting board, and the number of cells and the number of life-and-death cells per 1ml of cell floating liquid were calculated. From the number of day [of culture / 4th] cells, by making into the number of dead cells the cell dyed by trypan blue, calculate a survival rate, search for the breeding ratio of a cell from the number of seeding cells, and the number of day [of culture / 4th] cells, and the breeding ratio in the petri dish for cell cultures of a comparison sample is set to 1. The breeding ratio ratio of the cell on

the petri dish which has an elastin layer on a gelatin layer was calculated. In addition, the inverted microscope used the DIAPHOT-TMD type by NIKON CORP.

[0030] ** Hela on the petri dish which has an elastin layer on a day [of evaluation result culture / 4th] gelatin layer, and the petri dish for cell cultures of a comparison sample The survival rate of a cell and the breeding ratio ratio were shown in Table 2. Hela on the petri dish which has an elastin layer on a gelatin layer on the 4th day of culture although the survival rate of the cell was equivalent to the petri dish of a comparison sample The breeding ratio ratio of the cell was set to 0.6 in the petri dish which has an elastin layer on a gelatin layer when a comparison sample is set to 1, and growth of the active cancer cell of growth was suppressed.

[0031]

[Table 2]

表2 ヒト子宮頸癌由来 Hela細胞の
培養4日目における生存率及び増殖率比

	実施例2	比較例2
細胞生存率 (%)	9.7	9.6
細胞増殖率比(%)	0.6	1.0

[0032] Thus, it became clear that it was a material suitable for the small caliber artificial blood vessel which the surface of the artificial blood vessel by this invention can suppress excessive growth of a cell, and can stop the ***** thickness by the tissue in an artificial blood vessel inner surface of cavity or superfluous growth of a cell.

[0033]

[Effect of the Invention] [as mentioned above, the artificial blood vessel which the inner surface of cavity of the artificial blood vessel base material was made to carry out the

coacervation (condensation) of the water-soluble elastin, and constructed the bridge by the cross linking agent] Since it had the outstanding anti-thrombus nature and histocompatibility, it stopped the tissue near an anastomotic region, superfluous growth of a cell, and being un-implanted and anastomosis circles film ** thickness was not produced at all, it became clear that it is the artificial blood vessel over a long period of time in which ***** is possible also with a small caliber called the inside diameter of 4mm or less which is not in the former. the small caliber which can use this invention for reconstruction of the reconstruction and the popliteal artery of coronary arteries for lifesaving of the patient of ischemic heart disease, or a tibia artery -- a long period of time -- ***** -- a useful material is offered.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-33661

(43)公開日 平成8年(1996)2月6日

(51)Int.Cl.^a

A 61 F 2/06

A 61 L 27/00

33/00

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

P

T

審査請求 未請求 請求項の数12 OL (全 7 頁)

(21)出願番号

特願平6-171095

(22)出願日

平成6年(1994)7月22日

(71)出願人 000002141

住友ペークライド株式会社

東京都品川区東品川2丁目5番8号

(72)発明者 笹嶋 唯博

旭川市西神楽4-6-1-1584

(72)発明者 浅井 秀昭

秋田市土崎港相染町字中島下27-4 秋田
住友ペーク株式会社内

(72)発明者 田中 速雄

秋田市土崎港相染町字中島下27-4 秋田
住友ペーク株式会社内

(54)【発明の名称】 人工血管及びその製造方法

(57)【要約】

【構成】 合成樹脂から成る人工血管基材の内腔面に、直接、又はゼラチンもしくはコラーゲンを塗布し架橋剤で固定した上に、水溶性エラスチンをコアセルベーション(凝集)させ架橋剤によって固定した。

【効果】 人工血管内腔面に固定化されたエラスチンが、材料表面での血液の凝固活性を抑えると同時に細胞や組織の過剰成長を抑制し、吻合部内膜肥厚を抑制することで、小口径でも長期間にわたって高い開存性を発揮することが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 合成樹脂を管状にして作製した人工血管基材の内腔面に、水溶性エラスチンをコアセルベーション（凝集）させ架橋剤によって架橋して得られるエラスチン層を有するか、又は架橋剤によって架橋されたゼラチン層もしくはコラーゲン層を設け、更にその上に水溶性エラスチンをコアセルベーションさせ架橋剤によって架橋して形成されたエラスチン層を有することを特徴とする人工血管。

【請求項2】 水溶性エラスチンが、動物由来もしくはヒト由来のエラスチンを熱蕪酸処理して得られる α -エラスチンもしくは β -エラスチン、エラスチンをアルカリエタノール処理して得られる κ -エラスチン、又はエラスチンをペプシンもしくはエラスター酶によって酵素処理して得られる水溶性エラスチンであることを特徴とする、請求項1記載の人工血管。

【請求項3】 水溶性エラスチンの架橋剤が、グルタルアルデヒド、ジアルデヒドスター、もしくは水溶性エポキシ化合物であることを特徴とする、請求項1記載の人工血管。

【請求項4】 ゼラチン層もしくはコラーゲン層の架橋剤が、グルタールアルデヒド、ジアルデヒドスター、もしくは水溶性エポキシ化合物であることを特徴とする、請求項1記載の人工血管。

【請求項5】 人工血管基材が、合成樹脂を繊維状にし平織りもしくはメリヤス編みにて管状としたもの、合成樹脂を繊維状にしマンドレル上に巻取り積層して不織性の管状としたもの、合成樹脂を押し出し成形によって管状としたもの、合成樹脂に粒状塩化ナトリウム等の水溶性物質を加え押し出し成形によって管状とした後、これを水中に浸すことによって多孔性構造としたもの、又は、合成樹脂を押し出し成形によって管状とした後、延伸を加えて多孔性構造としたもののいずれかであることを特徴とする、請求項1記載の人工血管。

【請求項6】 人工血管基材を形成する合成樹脂が、ポリウレタン、ポリエステル、もしくはポリテトラフルオロエチレンであることを特徴とする、請求項5記載の人工血管。

【請求項7】 合成樹脂によって作製した人工血管基材の内腔に、水溶性エラスチンをpH=4~7の緩衝溶液に対して濃度が1~30wt%になる割合で加えた水溶性エラスチンの緩衝溶液を、4°C以上35°C未満にて充填し、人工血管基材を長手方向に水平に保ちながら、35°C以上70°C以下にて0.1~10rpmの速度で人工血管基材の円周方向に回転させて内腔面上にエラスチンをコアセルベーションさせた層を構築した後、内腔の溶液を排出し、次に水溶性架橋剤をpH=4~7の緩衝溶液に対して濃度が0.1~10wt%になる割合で溶解した架橋剤溶液を内腔に入れて、水溶性エラスチンのコアセルベート層を架橋させることによって、人工血管

の内腔面にエラスチン層を構築することを特徴とする人工血管の製造方法。

【請求項8】 合成樹脂によって作成した人工血管基材を、ゼラチンもしくはコラーゲンをpH=3~8の緩衝溶液に対して濃度が1~10wt%になる割合で加えた溶液中に浸すことによって、人工血管基材の繊維間もしくは多孔性人工血管基材の孔中にゼラチンもしくはコラーゲンを含浸させ、更に人工血管基材の内腔面上にもゼラチン層もしくはコラーゲン層を形成させ、架橋剤にてゼラチン層もしくはコラーゲン層を架橋させた後、該人工血管基材の内腔に、水溶性エラスチンをpH=4~7の緩衝溶液に対して濃度が1~30wt%になる割合で加えた水溶性エラスチンの緩衝溶液を、4°C以上35°C未満にて充填し、人工血管基材を長手方向に水平に保ちながら、35°C以上70°C以下にて0.1~10rpmの速度で人工血管基材の円周方向に回転させて、内腔面上にエラスチンをコアセルベーションさせた層を構築し、内腔の溶液を排出し、次に水溶性架橋剤をpH=4~7の緩衝溶液に対して濃度が0.1~10wt%になる割合で溶解した架橋剤溶液を内腔に入れて、水溶性エラスチンのコアセルベート層を架橋させることによって、人工血管の内腔面にエラスチン層を構築することを特徴とする人工血管の製造方法。

【請求項9】 人工血管の基材として、合成樹脂を繊維状にし平織りもしくはメリヤス編みにて管状としたもの、合成樹脂を繊維状にしマンドレル上に巻取り積層して不織性の管状としたもの、合成樹脂を押出し成形によって管状としたもの、合成樹脂に粒状塩化ナトリウム等の水溶性物質を加え押出し成形によって管状とした後、これを水中に浸すことによって多孔性構造としたもの、又は、合成樹脂を押出し成形によって管状とした後、延伸を加えて多孔性構造としたもののいずれかを用いることを特徴とする、請求項7又は8記載の人工血管の製造方法。

【請求項10】 人工血管の基材を作製する合成樹脂として、ポリウレタン、ポリエステル、もしくはポリテトラフルオロエチレンを用いることを特徴とする、請求項9記載の人工血管の製造方法。

【請求項11】 水溶性エラスチンを、グルタールアルデヒド、ジアルデヒドスター、もしくは水溶性エポキシ化合物によって架橋することを特徴とする、請求項7又は8記載の人工血管の製造方法。

【請求項12】 水溶性エラスチンとして、動物由来もしくはヒト由来のエラスチンを熱蕪酸処理し得られる α -エラスチンもしくは β -エラスチン、エラスチンをアルカリエタノール処理して得られる κ -エラスチン、又はエラスチンをペプシンもしくはエラスター酶によって処理して得られる水溶性エラスチンを用いることを特徴とする、請求項7又は8記載の人工血管の製造方法。

50 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、血管疾患の治療に際して、生体血管のバイパス術や置換術に使用される人工血管に関するものである。更に詳しくは、生体血管の内弾性板に類似した構造を人工血管の内腔面に形成することによって、血液の凝固と血漿蛋白の付着を抑制し、小口径でも内膜肥厚を起こさず、高い開存性を有する人工血管及びその製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、食生活の向上による糖尿病の増加や高齢化などにより、閉塞性動脈硬化症などの血管疾患が増加してきており、代用血管を用いた血行再建術が盛んに行われている。このような状況の中で様々な人工血管が開発されており、胸部大動脈や腹部大動脈、大腿動脈等の再建に使用できる、内径7~38mmの大口径人工血管は既に実用化されている。しかしながら、虚血性心疾患の患者の救命の為の冠状動脈の再建や膝下の膝窩動脈や脛骨動脈の再建には、専ら自家内胸動脈や大伏在静脈に頼っており、内径3~6mmの小口径人工血管の開発が望まれているが、これらの再建に満足して使用できる小口径人工血管は未だ開発されていないのが現状である。

【0003】人工血管に必要な性能として、優れた抗血栓性を有し、血栓による閉塞を生じないことと、優れた組織適合性を有し、早期に内膜や外膜が形成され安定化することが求められる。小口径人工血管では、特に血栓閉塞を免れるため優れた抗血栓性が不可欠の特性となるが、抗血栓性の高い人工血管ほど吻合部の組織過形成、即ち吻合部内膜肥厚を高度に形成して閉塞する。即ち抗血栓性と組織適合性は相反する特性であり、抗血栓性の高い材料は組織適合性が悪く、また、抗血栓性の高い材料の組織適合性を高めることは難しい（笹嶋唯博、N I KKE I M E D I C A L、1992年、2月10日号）。小口径では内腔が細いことと血流量が少ないとから、僅かな血栓や内膜肥厚の形成が閉塞原因となり、優れた抗血栓性と組織適合性の両立は小口径人工血管の開発における重要な課題である。

【0004】例えば、ダクロン人工血管は組織適合性は良好であるが抗血栓性は不十分であり、小口径人工血管には使用できない。一方、fibril length 30μ以下の一PTEF（延伸テフロン）製人工血管は抗血栓性が比較的良好であるが、吻合部内膜肥厚を形成しやすく、有孔度を高めて組織適合性を付与すれば抗血栓性が低下して、低血流量域では早期に血栓閉塞する。また、最近数種の化学修飾生体由来代用血管が開発されており、あるものは極めて良好な抗血栓性を示すが構造的に組織適合性が不良で、やはり何れも移植後数ヶ月で吻合部内膜肥厚を生じて、その多くは閉塞に至るという問題を有している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、従来の人工血管このような問題点を解決しようとするものである。ヒト臍帯静脈は発達したエラスチンを主成分とする内弾性板を有するが、これを化学固定したヒト臍帯静脈グラフトは、採取時や化学固定時に内弾性板が損傷、剥離され、この剥離部では血栓形成が顕著で、これに伴った内膜肥厚を発生するのに対して、内弾性板が温存されている部分は高い抗血栓性を示し、吻合部では内膜肥厚を発生しないことから、組織適合性も優れていることが示された（笹嶋唯博ら、人工臍器、20(2), 414-419(1991)）。これらの研究結果を背景として、エラスチン内膜の人工血管としての生物学的適合性に着目するとともに、生体由来のエラスチンを用いることで、人工血管内腔面に均一に内弾性板に匹敵する膜面を構築できることを見出し、鋭意研究して本発明を完成するに至ったものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】即ち本発明は、合成樹脂を管状にして作製した人工血管基材の内腔面に、水溶性エラスチンを架橋剤によって架橋して得られるエラスチン層を有するか、又は架橋剤によって架橋されたゼラチン層もしくはコラーゲン層を設け、更にその上に水溶性エラスチンを架橋剤によって架橋して形成されたエラスチン層を有する人工血管と、その製造方法に関するものである。

【0007】本発明で用いる人工血管基材は、血液の流路としてマクロファージなどの放出する過酸化物分解酵素や加水分解酵素の存在する生体内に長期間留置するため、生体内で酵素などにより分解されず、かつ毒性がなく、また血圧の変動に充分耐えられる材料であることが必要で、その材質としては、ポリウレタン、ポリエステル、ポリテトラフルオロエチレンなどの合成樹脂が好ましい。特にポリウレタンは、生体血管に近いコンプライアンスが得られるため好ましい。また、管状に作製した人工血管基材の内腔面に、ゼラチン、コラーゲン、エラスチン等を強固に固定するためには、内腔面の構造は多孔性、繊維を編んだもの、もしくは繊維が積み重なった構造のものが好ましい。その理由は、このような構造の基材ではゼラチン、コラーゲン、エラスチン等が基材の孔や繊維間に入り込み強いアンカー効果が得られるためである。

【0008】また、人工血管基材を合成樹脂を繊維状にしたものから作る場合、その繊維径は5~50μmの範囲とするのが適切である。5μm以下では平織り又はメリヤス編みとしたり、マンドレル上に積層して管状としたとき、繊維間隔が狭くなりすぎて、充分にゼラチンやコラーゲン、エラスチン等が入り込めず、強固に固定できないし、生体内へ植込んだ後も細胞が入り込めず巧く治癒することができない。繊維径50μm以上では繊維間隔が広すぎて、ゼラチンやコラーゲン、エラスチン等

を固定する足場が少なく、強固にこれらを固定できない。

【0009】また、本発明で用いることのできるエラスチンは特に限定はしないが、ブタ大動脈由来エラスチン、ウシ頸韌帶由来エラスチン、ウシ肺由来エラスチン、ウシ大動脈由来エラスチン、ヒト肺由来エラスチン、ヒト大動脈由来エラスチンなどのエラスチン、又はこれらを熱磷酸処理によって水溶性にした α -エラスチンもしくは β -エラスチン、アルカリエタノール処理によって水溶性にした α -エラスチン、ペプシン、エラスターなど酵素で処理し水可溶性にしたエラスチン蛋白質などが挙げられる。中でも組織適合性と抗血栓性の点でヒト大動脈由来エラスチンが望ましく、その理由の詳細は不明であるが、エラスチンはその由来部位と動物の種類によって若干アミノ酸組成が異なり、ヒト大動脈由来エラスチンの有するアミノ酸組成では特に架橋後の裏面を平滑にできるため、血液の凝固活性を引き起こし難い為と考えられる。

【0010】また、本発明で用いるゼラチン、およびコラーゲンとしては、動物由来の物が利用できる。エラスチン層を設ける前に予めゼラチンもしくはコラーゲンの層を設ける目的は、主として、前記のように多孔性構造を有する人工血管基材の内表面の孔部を充填して、人工血管内腔面の平滑性を高めるためである。ゼラチン層やコラーゲン層は血液と直接接触し、あるいは作用するものではないが、人工血管内腔面をミクロ的に平滑にすることにより、血液の凝固活性を抑制することが可能になる。

【0011】本発明で人工血管の基材内面にゼラチン層又はコラーゲン層を形成する工程において、ゼラチン又はコラーゲンを溶解するpH=3~8の緩衝液は特に限定はしないが、クエン酸/水酸化ナトリウム緩衝液、ギ酸/ギ酸ナトリウム緩衝液、クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液、酢酸/酢酸ナトリウム水溶液、コハク酸/水酸化ナトリウム水溶液、リン酸緩衝溶液、リン酸二水素ナトリウム/水酸化ナトリウム緩衝液などが挙げられる。中でもゼラチンに対してはpH=7の緩衝液が望ましく、コラーゲンに対してはpH=3~3の緩衝溶液が好ましい。この理由はゼラチンはpH=7付近で安定して架橋できるし、またコラーゲンはpH=4以上では沈澱が生じやすく安定した水溶液と出来ないためである。

【0012】また同工程において、ゼラチン及びコラーゲンの濃度は緩衝溶液に対し1~10wt%の範囲が好ましい。この理由は、濃度が低すぎると充分な厚さのゼラチン層又はコラーゲン層が得られず基材が露出してしまうし、濃度が高すぎると溶液の粘度が上昇し、人工血管基材の孔や網目内に入していくことができないし、ゼラチンやコラーゲンを架橋して得られる人工血管内腔面をミクロ的に平滑にするのが難しいためである。

【0013】また、人工血管の基材の内腔面上に直接又

はゼラチン層もしくはコラーゲン層を設けた人工血管内腔面上に水溶性エラスチンをコアセルベーション(凝集)させる工程において用いる緩衝溶液も、pH=4~7の範囲のものであればよく特に限定はされない。前記のゼラチン又はコラーゲンを溶解するため緩衝液と同じものが使用できるが、中でもpH=5で充分な緩衝能を持つクエン酸/水酸化ナトリウム緩衝液、クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液、酢酸/酢酸ナトリウム水溶液、コハク酸/水酸化ナトリウム水溶液などが、水溶性エラスチンをコアセルベーションさせるのに適している。これは水溶性エラスチンの等電点がこの付近に有り、電気的に中和されたエラスチンが疏水-疏水相互作用を生じやすく、コアセルベーションが安定するためであると考えられる。

【0014】また、水溶性エラスチンを緩衝溶液に溶解する量は、pH=4~7の緩衝液に対して1~30wt%の範囲で用いることができる。この理由はエラスチンの濃度が1wt%より低すぎると水溶性エラスチンがコアセルベーションし難く、30wt%より濃度が高すぎると人工血管の内腔面に形成されるエラスチン層が不均一になってしまう為である。また、温度は70°Cより高い温度ではエラスチンの変性が生じやすいし、35°C未満の低温では水溶性エラスチンをコアセルベーションさせることができないため35~70°Cの範囲が好ましい。

【0015】さらに、人工血管の基材の内腔面上に直接又はゼラチン層もしくはコラーゲン層を設けた内腔面上にエラスチン層を形成するには、水溶性エラスチンの溶液を塗布し架橋剤にて架橋したり、予め架橋剤と混合した水溶性エラスチンを塗布し加熱や光によって架橋することも可能であるが、コアセルベーションさせた後で架橋するほうが、形成されたエラスチン層の抗血栓性と組織適合性が良好であるため好ましい。この理由は明確ではないが、エラスチンは生体内でコアセルベート(凝集体)を形成した状態で存在しており、この時の分子の三次構造がエラスチンの生理活性に重要であるためと考えられる。

【0016】本発明における各工程において、ゼラチン層、コラーゲン層、あるいはコアセルベーションさせた水溶性エラスチンの層等を架橋させるための架橋剤としては、水溶性の架橋剤であるグルタルアルデヒドやジアルデヒドスター、もしくは水溶性のエポキシ化合物等が使用できるが、中でも水溶性エポキシ化合物は、アミノ基とカルボキシル基の両方の官能基と反応でき、また、架橋後は柔らかい蛋白層を与えるため生体血管に近いコンプライアンスを得ることができ、特に好ましい。

【0017】また、水溶性エラスチンを人工血管内腔面に均一にコアセルベーションさせるためには、作製する人工血管の内径にもよるが、エラスチン水溶液を充填した人工血管を長手方向に水平に保ちながら、内径2~6mmの人工血管では円周方向に0.1~10rpmの回

転速度で静かに回転させるのが好ましい。この理由は、エラスチンを35°C以上の温度で静置すると、重力方向にエラスチンがコアセルベーションしてコアセルベート（凝集体）を形成する特性を利用するため、回転速度が速すぎると内腔に充填したエラスチン溶液が攪拌されてしまい、巧くコアセルベーションを内腔面上に形成できないし、回転速度が遅すぎるとエラスチンのコアセルベーション速度より人工血管内腔面の移動速度が遅くなるため、人工血管内腔面に均一にエラスチン層を形成することができないためである。

【0018】

【実施例】以下に、実施例によって本発明の効果を説明する。

【実施例1、及び比較例1】

① 溶液の調製及び人工血管の製作

ポリウレタン樹脂（米国エチコン社製バイオマー）を直径10 μmの繊維状に押出し、直径4 mm φ ×長さ1 m のステンレス製マンドレルに巻きとることで、内径4 mm φ ×長さ1 m の網目状人工血管基材を作製した。また、牛頸動脈由来エラスチン（エラスチン・プロダクト社製）を熱蘇酸処理して水溶性にし、コアセルベーションによって凝集させて精製したα-エラスチン400 mgを、20 ml のpH=4.0酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液に4°Cによって溶解しエラスチン水溶液を作製した。

【0019】次に、上記で得られた人工血管基材を10 cmの長さに切断し、内径4.5 mm φ ×12 cm のガラス管で、両端に三方コックを取り付け、更に中央部にギヤーを取り付けてモーターによって回転できるようにした治具の中に挿入し装着した。一方の三方コックからエラスチン水溶液を充填し、60°Cに加熱しながらモーターをスターさせ、5 rpmで12時間回転させてエラスチンを人工血管基材の内面にコアセルベーションさせた。ここで、三方コックを開いて管内の溶液を捨て、続いて20 mgの水溶性エポキシ架橋剤（デナコールEX-614B、長瀬産業製）をpH=7.0のリン酸緩衝液20 ml に溶解した水溶液を人工血管内に充填し、5 rpmの速度で回転させながら60°Cにて24時間架橋を行い、内腔面に約100 μmの厚みのエラスチン層を有する人工血管を得た。

【0020】② 動物実験

体重11 kgのビーグル成犬（雌性）1頭をアトロビンにて前処理し、導入麻酔をフルニトラゼパム0.1 mg/kg、ケタミン3 mg/kgの静注によって実施した。犬を手術台に固定後、ヘパリン（100 U/kg）を静注し、フローセンによる麻酔を維持しながら、腹部を切開して腎動脈下腹部大動脈を5 cm 切除し、ここに6-0ポリプロピレン糸を用い端々吻合によって内径4 mm φ ×長さ5 cmの本発明のエラスチン層を有する人

工血管を植え込んだ。また、比較例として内径4 mm φ ×長さ5 cmのグルタールアルデヒド処理ヒト臍帯静脈人工血管（Dardik Biograft）を、体重11 kgの雑種成犬（雌性）の腎動脈下腹部大動脈に植え込んだ。

【0021】術後、抗凝固剤は一切使用せず6ヶ月間イヌを飼育した。6ヶ月後、イヌをアトロビンにて前処理し、導入麻酔をフルニトラゼパム0.1 mg/kg、ケタミン3 mg/kgの静注によって実施し、犬を手術台に固定後、ヘパリン（100 IU/kg）を静注し、フローセンによる麻酔を維持しながら、腹部を切開し、腎動脈下腹部大動脈に植え込んだ両人工血管を宿主血管と共に摘出した。直ちに、注射器を用いて2500 IU/500 mlのヘパリンを溶解した生理食塩水にて人工血管の内外面を静かに洗浄し、血液を洗い流し、人工血管を縦に切り開き肉眼的に観察し、本発明のエラスチン層を有する人工血管と比較例のDardik Biograftとの比較を行った。

【0022】次に、人工血管を縦に2つ割りにし、一方を4%ホルマリンの中性緩衝溶液に浸漬して固定した後、光学顕微鏡用試料とした。残りの試料は、1%グルタールアルデヒドの中性緩衝溶液及び3%グルタールアルデヒドの中性緩衝溶液に浸して固定し、電子顕微鏡用試料とした。光学顕微鏡用試料は中枢側吻合部、中央部、末梢側吻合部の3つに切断し、ホルマリンを洗浄した後、パラフィン包埋し、各部位から切片を切り出しブレバートとした。次にヘマトキシリン液に5分浸し、水洗後、1%エオジン液に浸し、水洗、脱水、封入して染色を行った。光学顕微鏡による観察は40倍と100倍にて実施し、中枢側吻合部、中央部、末梢側吻合部で

30 それぞれ新生した内膜の厚みを計測し、本発明のエラスチン層を有する人工血管と比較例のDardik Biograftとの内膜肥厚の程度を比較した。

【0023】また、電子顕微鏡用試料はグルタールアルデヒド固定後、0.1 Mカゴジル酸ナトリウム緩衝溶液にて十分洗浄し、試料を中枢側吻合部、中央部、末梢側吻合の3つに分け、1%オスミウム、1%タンニン酸で導電処理を行った後、t-ブタノール凍結乾燥によって乾燥し、試料台に固定してPt-Pdを蒸着した。電子顕微鏡観察は本発明のエラスチン層を有する人工血管と比較例のDardik Biograftの内腔面の状態を200倍と1000倍にて観察し評価した。

【0024】尚、光学顕微鏡はニコン社製DIAPHOT-T-TMD型を使用し、走査型電子顕微鏡は日立製S-2400型を使用した。

③ 評価結果
実施例及び比較例の各人工血管の評価結果は、表1に示した通りであった。

【0025】
【表1】

表1 人工血管の評価結果

評価項目	実施例1	比較例1
内眼的観察結果	内腔面は全体に光沢のある白色を呈し、血栓の付着は見られず、中権及び末梢の両吻合部とも縫合糸が透けて見え、吻合部パンヌスは見られなかった。	内腔面は光沢のある白色を呈している部分もあったが、所々に血栓の付着が見られ、末梢側吻合部にて吻合部パンヌスの成長と剥離が認められた。
光顕的観察結果 (組織評価)	中権側吻合部、末梢側吻合部では表面に一層の細胞層を持つ、平均 $20\ \mu\text{m}$ の新生内膜層が見られた。宿主血管と人工血管との吻合部は平滑で吻合部内膜肥厚は全く見られなかつた。中央部では数ミクロンの僅かな纖維成分の付着が見られたのみで内膜の肥厚は見られなかつた。	末梢側吻合部では最大 $300\ \mu\text{m}$ の吻合部内膜肥厚が認められた。中権側吻合部でも極度であるが $150\ \mu\text{m}$ 程度の内膜の肥厚が認められた。中央では纖維成分の付着が主に見られ、細胞成分は見られなかつた。
走査型電子顕微鏡 観察結果	中権側及び末梢側吻合部では吻合部から $5\ \text{mm}$ 程度まで内皮細胞様の細胞で覆われていたが、細胞の過剰成長や内膜の肥厚は見られなかつた。中央部では血漿蛋白と思われる蛋白成分の僅かな付着が見られたが、血球やフィブリンなどの付着は見られなかつた。	末梢側吻合部では吻合部から人工血管へ約 $5\ \text{mm}$ 程度まで新生内膜が剥離したパンヌスの下に器質化した血栓とともに血球成分を多量に含む纖維状の付着物が観察された。中権側吻合部では内皮細胞様細胞の伸展が見られたが、所々フィブリンの付着が認められた。中央部では血漿蛋白と思われる蛋白成分の付着が主で所々にフィブリンの付着が認められた。

【0026】〔実施例2、及び比較例2〕

① 溶液の調製、及びゼラチン層上にエラスチン層を有するシャーレの作製
2%ゼラチンのリン酸緩衝溶液($\text{pH}=7$)を、 $35\text{m}\phi$ の細胞培養用シャーレ(住友ベークライト(株)製MS-1035)に 2ml 添加して均一に広げた後、 4°C にて2時間静置し、ゼラチンをゲル化させた。その後、2%グルタールアルデヒドのリン酸緩衝液($\text{pH}=7$) 3ml を添加し、 4°C で24時間静置し、架橋を行つた。

【0027】次に、牛頸韌帯由来エラスチン(エラスチン・プロダクト社製)を熱蔵酸処理して水溶性にし、コアセルベーションによって凝集させて精製した α -エラスチン 40mg を、 2ml の $\text{pH}=4.0$ 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液に 4°C で溶解した溶液を調製し、上記のゼラチン層を固定したシャーレ内に添加し、 50°C にて12時間静置し、エラスチンをゼラチン層の上にコアセルベーションさせた。ここでシャーレ内の溶液を捨て、 20mg の水溶性エポキシ架橋剤(デナコールEX-521、長瀬産業製)を $\text{pH}=7.0$ のリン酸緩衝液 20ml に溶解した水溶液 3ml をシャーレ内に添加し、密栓をして、 60°C にて24時間架橋を行い、ゼラチン層*

* 上にエラスチン層を有する内径 3.5mm のシャーレ作製した。

【0028】② 細胞培養

ゼラチン層上にエラスチン層を有する内径 3.5mm のシャーレ、及び比較試料として未処理の内径 3.5mm の細胞培養用シャーレにそれぞれ 1×10^4 個/ ml 濃度のヒト子宮頸癌由来HeLa細胞を 2ml づつ播種し、コウシ血清10% (大日本製薬製)を含む基本培地MEM(大日本製薬製)で4日間 37°C にて培養した。培地を2日毎に新しいものに交換し、培養4日目にセルスクレーパーで細胞を全て剥がし、細胞の浮遊溶液とした。

【0029】次に、この細胞浮遊溶液 $100\text{ }\mu\text{l}$ に 0.3% トリパンブルーのリン酸緩衝液 $100\text{ }\mu\text{l}$ を加えて染色し、血球計算板上で倒立顕微鏡により対物レンズ10倍にて観察し、細胞浮遊液 1ml 当たりの細胞数及び生死細胞数を計算した。培養4日目の細胞数から、トリパンブルーにより染色された細胞を死細胞数として生存率を計算し、播種細胞数と培養4日目の細胞数から細胞の増殖率を求め、比較試料の細胞培養用シャーレでの増殖率を1として、ゼラチン層上にエラスチン層を有するシャーレ上での細胞の増殖率比を計算した。尚、倒立

11

顕微鏡はニコン社製DIA PHOT-TMD型を使用した。

【0030】③ 評価結果

培養4日目のゼラチン層上にエラスチン層を有するシャーレ、及び比較試料の細胞培養用シャーレ上でHela細胞の生存率、増殖率比を表2に示した。培養4日目で、ゼラチン層上にエラスチン層を有するシャーレ上でHela細胞の生存率は、比較試料のシャーレと同等であったが、細胞の増殖率比は比較試料を1としたとき、ゼラチン層上にエラスチン層を有するシャーレでは0.6となり、増殖の活発な癌細胞の増殖が抑えられていた。

【0031】

【表2】

表2 ヒト子宮頸癌由来 Hela細胞の
培養4日目における生存率及び増殖率比

	実施例2	比較例2
細胞生存率 (%)	97	96
細胞増殖率比(%)	0.6	1.0

12

【0032】このように、本発明による人工血管の表面は細胞の過激な増殖を抑えることができ、人工血管内腔面での組織や細胞の過剰成長による内膜肥厚を抑えることができる、小口径人工血管に適した材料であることが判明した。

【0033】

【発明の効果】以上のように、人工血管基材の内腔面に水溶性エラスチンをコアセルベーション（凝集）させ、架橋剤によって架橋した人工血管は、優れた抗血栓性と組織適合性を併せ持ち、吻合部付近での組織や細胞の過剰成長や未着床を抑え、吻合部内膜肥厚を全く生ずることがないため、従来はない内径4mm以下といった小口径でも長期間にわたる開存が可能な人工血管であることが明白となった。本発明は、虚血性心疾患の患者の救命の為の、冠状動脈の再建や膝窩動脈や脛骨動脈の再建に用いることができる小口径でも、長期間開存する有用な材料を提供するものである。